

IFW

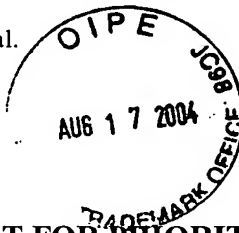
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mitsuyoshi OKUDA, et al.

SERIAL NO: 10/820,714

FILED: April 9, 2004

FOR: ALKALINE PROTEASE



GAU:

EXAMINER:

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2003-106709	April 10, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

K575905
10/820,714

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 9]

願 人 花王株式会社
Applicant(s):

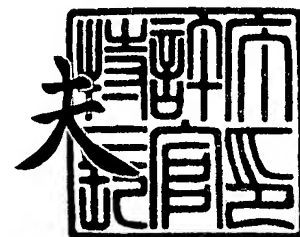
BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 4 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P01501504

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

C12N 9/50

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 奥田 光美

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 佐藤 剛

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 瀧村 靖

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 住友 伸行

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 小林 徹

【発明者】

【住所又は居所】 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内

【氏名】 野村 昌史

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の(a)15位、(b)16位、(c)166位、(d)167位、(e)187位、(f)346位、(g)405位、又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置；ヒスチジン、
- (b) 位置；スレオニン又はグルタミン、
- (c) 位置；グリシン、
- (d) 位置；バリン、
- (e) 位置；セリン、
- (f) 位置；アルギニン、
- (g) 位置；アスパラギン酸、

であるアルカリプロテアーゼ。

【請求項2】 配列番号1で示されるアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼにおいて、配列番号1で示されるアミノ酸配列の(a)15位、(b)16位、(c)166位、(d)167位、(e)187位、(f)346位、(g)405位、又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置；ヒスチジン、
- (b) 位置；スレオニン又はグルタミン、
- (c) 位置；グリシン、
- (d) 位置；バリン、
- (e) 位置；セリン、
- (f) 位置；アルギニン、
- (g) 位置；アスパラギン酸、

であるアルカリプロテアーゼ。

【請求項3】 請求項1又は2記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺

伝子。

【請求項 4】 請求項 3 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 5】 請求項 4 記載のベクターを含む形質転換体。

【請求項 6】 宿主が微生物である請求項 5 記載の形質転換体。

【請求項 7】 請求項 1 又は 2 記載のアルカリプロテアーゼを含む洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は洗浄剤配合酵素として有用なアルカリプロテアーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

産業分野でのプロテアーゼ利用の歴史は古く、衣料用洗剤をはじめとする洗浄剤から繊維の改質剤、皮革処理剤、化粧品、浴剤、食品改質剤或いは医薬品としての利用まで非常に多岐にわたっている。中でも最も工業的に大量に生産されているものが洗剤用プロテアーゼであり、例えば、アルカラーゼ、サビナーゼ（登録商標；ノボザイムズ）、マクサカル（登録商標；ジェネンコア）、ブラップ（登録商標；ヘンケル）、及び K A P（花王）等が知られている。

【0 0 0 3】

洗剤中にプロテアーゼを配合する目的は、衣料に付着したタンパク質汚れを分解することであるが、実際の汚れはタンパク質だけでなく皮脂由来の脂質や固体粒子等、有機物と無機物が入り混じった複数の成分を内包する複合汚れであり、このような複合汚れに対する洗浄性の高い洗浄剤が望まれていた。

【0 0 0 4】

斯かる観点から本発明者らは、高濃度の脂肪酸存在下でも十分なカゼイン分解活性を保持し、タンパク質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有する分子量約 4 3, 0 0 0 のアルカリプロテアーゼを数種見出し、先に特許出願した（特許文献 1 参照）。斯かるアルカリプロテアーゼ群は、その

分子量、一次構造、酵素学的性質、特に非常に強い酸化剤耐性を有する点で、従来から知られているバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼであるズブチリシンとは異なり、新しいズブチリシンサブファミリーに分類することが提唱されている（例えば、非特許文献1参照）。

【0005】

このように洗浄性に優れたプロテアーゼを工業的に大量生産するには、生産性を高める必要があり、生産性を向上させる方法としては、生産菌の変異育種による改良やプロテアーゼをコードする遺伝子あるいはその発現制御に関わる遺伝子を改変してタンパク質分泌量を高める方法がある。また、プロテアーゼをコードする遺伝子を改変して、比活性を向上させても良く、本発明者らは斯かる観点から、タンパク質分泌能や比活性が向上した変異アルカリプロテアーゼを既に見出している（特許文献2、特許文献3、特許文献4参照）。

【0006】

しかしながら、大量に且つ廉価な酵素を生産するには更なる生産性の向上が求められており、その一手段としてタンパク質分泌量、比活性の向上が求められていた。

【0007】

本発明は複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、タンパク質分泌量、比活性が向上し、且つ高い生産性を有するアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

【0008】

【特許文献1】

国際公開第99/18218号パンフレット

【特許文献2】

特願平14-304230号

【特許文献3】

特願平14-304231号

【特許文献4】

特願平14-304232号

【非特許文献 1】

Saekiら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, 313-319, 2000

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持しつつ、タンパク質分泌量、比活性の向上した新たな酵素の探索を行ったところ、ある種のアルカリプロテアーゼにおいて、当該アミノ酸配列中の特定位置に特定のアミノ酸残基が必要であることを見出した。

【0010】

すなわち、本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の (a) 15 位、(b) 16 位、(c) 166 位、(d) 167 位、(e) 187 位、(f) 346 位、(g) 405 位、又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

- (a) 位置；ヒスチジン、
- (b) 位置；スレオニン又はグルタミン、
- (c) 位置；グリシン、
- (d) 位置；バリン、
- (e) 位置；セリン、
- (f) 位置；アルギニン、
- (g) 位置；アスパラギン酸、

であるアルカリプロテアーゼ及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。

【0011】

また本発明は、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体を提供するものである。

【0012】

また本発明は、該アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のアルカリプロテアーゼは、上記のように、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の (a) 1 5 位、(b) 1 6 位、(c) 1 6 6 位、(d) 1 6 7 位、(e) 1 8 7 位、(f) 3 4 6 位、(g) 4 0 5 位、又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が、(a) 位置；ヒスチジン、(b) 位置；スレオニン又はグルタミン、(c) 位置；グリシン、(d) 位置；バリン、(e) 位置；セリン、(f) 位置；アルギニン、(g) 位置；アスパラギン酸であるものである。

【0 0 1 4】

すなわち、本発明のアルカリプロテアーゼは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼにおける前記 (a) ～ (g) から選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列の当該位置に相当する位置のアミノ酸残基が特定のアミノ酸残基であるプロテアーゼを意味し、これらは野生型、野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

【0 0 1 5】

ここで、「他種アルカリプロテアーゼ」としては、野生型又は野生型の変異体であってもよく、酸化剤耐性を有し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 法による分子量が 43,000 ± 2,000 であることが好ましく、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるものが挙げられる。特に好ましくは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、pH 8 以上のアルカリ性領域で作用する、酸化剤耐性を有する、50℃、pH 10 で 10 分間処理したとき 80% 以上の残存活性を示す、ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) 及びフェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) で阻害され、SDS-PAGE による分子量が 43,000 ± 2,000 である酵素が挙げられる。ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを 50 mM 過酸化水素、5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM ブリットンロビンソン緩衝液 (pH 10) 中で、30℃、20 分間の放置後の残存活性が少なくと

も 50%以上を保持していることをいう。

【0016】

ここで、「配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ」としては、KP43 [バチルス エスピー KSM-KP43 (FERM BP-6532) 由来、国際公開第99/18218号パンフレット] が挙げられ、「配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアルカリプロテアーゼ」としては、例えばプロテアーゼ KP9860 (GenBank Accession No. AB046403) [バチルス エスピー KSM-9860 (FERM BP-6534) 由来、国際公開99/18218号パンフレット]、プロテアーゼ9865 (GenBank Accession No. AB084155) [バチルス エスピー KSM-9865 (FERM P-1592) 由来、特願2002-002653]、プロテアーゼE-1 (GenBank Accession No. AB046402) [バチルス No. D-6 (FERM P-1592) 由来、特開昭49-71191号公報]、プロテアーゼYa (GenBank Accession No. AB046404) [バチルス エスピー Y (FERM BP-1029) 由来、特開昭61-280268号公報]、プロテアーゼSD521 (GenBank Accession No. AB046405) [バチルス SD521 (FERM P-11162) 由来、特開平3-191781号公報]、プロテアーゼA-1 (GenBank Accession No. AB046406) [NCIB12289由来、国際公開第88/01293号パンフレット]、プロテアーゼA-2 [NCIB12513由来、国際公開第98/56927号パンフレット]や、特開2002-218989号報、特開2002-306176号報に記載の変異プロテアーゼ、配列番号1で示されるアミノ酸配列の251位をそれぞれアスパラギン、スレオニン、イソロイシン、バリン、ロイシン及びグルタミンに置換した変異体、256位をそれぞれセリン、グルタミン、アスパラギン、バリン及びアラニンに置換した変異体 (特願2001-329472号)、配列番号1で示されるアミノ酸配列の65位をプロリンに置換した変異体、101位をアスパラギンに置換した変異体、273位をイソロイシン、グリシン及

ビスレオニンにそれぞれ置換した変異体、320位をフェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン及びグリシンにそれぞれ置換した変異体、359位をセリン、ロイシン、バリン、イソロイシン及びグルタミンにそれぞれ置換した変異体、387位をアラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン及びヒスチジンにそれぞれ置換した変異体（特願2002-304230号）、配列番号1で示されるアミノ酸配列の163位をヒスチジン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、リジン、アスパラギン、セリン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、スレオニン及びバリンに置換した変異体、170位をバリン及びロイシンに置換した変異体、171位をアラニン、グルタミン酸、グリシン及びスレオニンに置換した変異体（特願2002-304231号）又はこれらとアミノ酸配列において80%以上、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが挙げられる。

【0017】

なお、アミノ酸配列の相同性は、リップマン-パーソン（Lipman-Pearson）法（Science, 227, 1435, 1985）によって計算される。

【0018】

また、「相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。プロテアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各プロテアーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

【0019】

すなわち、上記方法でアミノ酸配列を整列させた図1より、（a）配列番号1で示されるアミノ酸配列における15位のアミノ酸残基はセリン残基であるが、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例

例えばプロテアーゼ E-1 においては 15 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はヒスチジン残基であるのが好ましい。

【0020】

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 16 位のアミノ酸残基はセリン残基であるが、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ E-1 においては 16 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はスレオニン残基又はグルタミン残基であるのが好ましい。

【0021】

(c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 166 位のアミノ酸残基はアスパラギン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ Y a においては 165 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はグリシン残基であるのが好ましい。

【0022】

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 167 位のアミノ酸残基はグリシン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ Y a においては 166 位のセリン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はバリン残基であるのが好ましい。

【0023】

(e) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 187 位のアミノ酸残基はアスパラギン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ S D-521 においては 186 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はセリン残基であるのが好ましい。

【0024】

(f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 346 位のアミノ酸残基はリジン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の

方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ K P 9 8 6 0 においては 3 4 6 位のリジン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はアルギニン残基であるのが好ましい。

【0025】

(g) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 4 0 5 位のアミノ酸残基はアスパラギン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼ K P 9 8 6 0 においては 4 0 5 位のアスパラギン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はアスパラギン酸残基であるのが好ましい。

【0026】

プロテアーゼ K P 4 3 のアミノ酸配列 (配列番号 1) の (a) 1 5 位、(b) 1 6 位、(c) 1 6 6 位、(d) 1 6 7 位、(e) 1 8 7 位、(f) 3 4 6 位、(g) 4 0 5 位、又はこれに相当する位置のアミノ酸残基に相当する位置及びアミノ酸残基の具体例を、上記「他種アルカリプロテアーゼ」のうちの好適に用いられるもので示す (表 1)。

【0027】

【表 1】

位置	プロテアーゼ							
	KP43	KP9860	9865	E-1	Ya	SD-521	A-1	A-2
(a)	Ser15	Ser15	Ser15	Asn15	Asn15	Asn15	Ser15	Asn15
(b)	Ser16	Ser16	Ser16	Asn16	Asn16	Asn16	Ser16	Asn16
(c)	Ser166	Ser166	Ser166	Asn165	Asn165	Asn165	Asn166	Gly165
(d)	Gly167	Gly167	Gly167	Ser166	Ser166	Ser166	Gly167	Ser166
(e)	Asn187	Asn187	Asn187	Asn186	Asn186	Asn186	Asn187	Asn186
(f)	Lys346	Lys346	Lys346	Lys345	Lys345	Lys345	Lys346	Lys345
(g)	Asn405	Asn405	Asn405	Asn404	Asn404	Asn404	Asn405	Asn404

【0028】

また、本発明アルカリプロテアーゼにおけるアミノ酸残基の (a) ~ (g) の選択は、酵素特性が変化しない限り、(a) ~ (g) から選ばれる置換が 2 個所以上同時になされていても良い。2 箇所以上が同時になされた場合の好ましい具体例を以下に示す。尚、アミノ酸は 3 文字表記とし、「+」は 1 アミノ酸の置換

に対し付加された置換を表している。

【0029】

2個所置換されたものの例としては、Ser15His+Ser16Thr、Ser15His+Ser16Gln、Lys346Arg+Asn405Asp、Asn187Ser+Lys346Arg、Asn166Gly+Gly167Val等が挙げられるが、Ser15His+Ser16Gln、Lys346Arg+Asn405Asp、Asn166Gly+Gly167Valが特に好ましい。

【0030】

3個所置換されたものの例としては、Ser15His+Ser16Thr+Asn187Ser、Ser15His+Ser16Gln+Asn187Ser、Asn187Ser+Asn166Gly+Gly167Val等が挙げられるが、Ser15His+Ser16Gln+Asn187Ser、Asn187Ser+Asn166Gly+Gly167Valが特に好ましい。

【0031】

さらに4ヶ所から7ヶ所置換されたものであっても本発明の要件を満たす限り構わない。

【0032】

本発明のアルカリプロテアーゼが変異体である場合、変異を施す前のアルカリプロテアーゼ（親アルカリプロテアーゼということがある）としては、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼ」又は上述した「他種アルカリプロテアーゼ」として示したものが該当し、これに目的部位の変異を施すことにより本発明のアルカリプロテアーゼが得られる。例えばプロテアーゼKP43の配列番号1で示されるアミノ酸配列の前記（a）～（g）より選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列において当該位置に相当する位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することにより得られる。

【0033】

本発明アルカリプロテアーゼは、例えば以下の方法により得ることができる。

すなわち、クローニングされた親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子（配列番号 2：成熟酵素領域すなわち配列番号 1 をコードする遺伝子は 6 1 9 番目のコドン以降で示される）に対して変異を施し、得られた変異遺伝子を用いて適当な宿主菌を形質転換し、当該組換え宿主菌を培養し、培養物から採取することにより得られる。親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングは、一般的な遺伝子組換え技術を用いればよく、例えば国際公開第 9 9 / 1 8 2 1 8 号パンフレット、国際公開第 9 8 / 5 6 9 2 7 号パンフレットに記載の方法に従って行えばよい。

【 0 0 3 4 】

親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部位特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えば Site-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km キット（タカラ）等を用いて行うことができる。また、リコンビナント P.C.R. (polymerase chain reaction) 法 (PCR protocols, Academic press, New York, 1990) を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【 0 0 3 5 】

得られた変異遺伝子を用いた本発明プロテアーゼの生産方法としては、例えば当該変異遺伝子を安定に増幅できる DNA ベクターに連結させ宿主菌を形質転換する、或いは当該変異遺伝子を安定に維持できる宿主菌の染色体 DNA 上に導入させる、等の方法が採用できる。この条件を満たす宿主菌としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌などが挙げられ、これらの菌株を用い、資化性の炭素源、窒素源その他必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

【 0 0 3 6 】

斯くして得られた培養液中からのアルカリプロテアーゼの採取、及び精製は、一般の酵素の採取、及び精製方法に準じて行うことができる。例えば、培養液を遠心分離、又は濾過することで菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得る。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもで

きるが、更に公知の方法により精製、結晶化、粉末化、または顆粒化することもできる。

【0037】

得られた本発明のアルカリプロテアーゼは、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEによる分子量が43,000 \pm 2,000であり、アルカリ性域で活性を有すると共に、親アルカリプロテアーゼに比べ、比活性の向上、タンパク質分泌量の向上が認められるという性質を新に獲得したものである。

従って、本発明のアルカリプロテアーゼは、各種洗剤組成物配合用酵素として有用である。

【0038】

洗剤組成物中への本発明品プロテアーゼの配合量は、アルカリプロテアーゼが活性を示す量であれば特に制限されないが、洗剤組成物1kg当たり0.1～5000PUが配合できるが、経済性等を考慮し、500PU以下が好ましい。

【0039】

本発明の洗剤組成物は本発明品プロテアーゼ以外に様々な酵素を併用することもできる。例えば、加水分解酵素、酸化酵素、還元酵素、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、シンテターゼ等である。このうち、本発明以外のプロテアーゼ、セルラーゼ、ケラチナーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プルラナーゼ、ペクチナーゼ、マンナナーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ等が好ましく、特にプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼが好ましい。プロテアーゼとしては市販のアルカラーゼ、エスペラーゼ、サビナーゼ、エバラーゼ、カンナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、プロペラーゼ、プラフェクト（登録商標；ジェネンコア社）、またKAP（花王）、等が挙げられる。セルラーゼとしてはセルザイム、ケアザイム（登録商標；ノボザイムズ社）、またKAC、特開平10-313859号公報記載のバチルス・エスピーKSM-S237株が生産するアルカリセルラーゼ、特願2002-116553

号公報記載の変異アルカリセルラーゼ（以上、花王）等が挙げられる。アミラーゼとしてはターマミル、デュラミル（登録商標；ノボザイムズ社）、プラスター（登録商標；ジェネンコア社）、また KAM（花王）、等が挙げられる。リパーゼとしてはリポラーゼ、リポラーゼウルトラ（登録商標；ノボザイムズ社）が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

洗浄剤組成物中で本発明品プロテアーゼ以外のプロテアーゼを併用する場合の配合量は、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 0. 1 ～ 5 0 0 P U が好ましい。セルラーゼを併用する場合は、特開平 1 0 - 3 1 3 8 5 9 号公報の段落 [0 0 2 0] に記載の酵素活性測定方法より決定される単位（K U）に基づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 3 0 0 ～ 3 0 0 0 0 0 0 K U が好ましい。

【 0 0 4 1 】

またアミラーゼを併用する場合は、特開平 1 1 - 4 3 6 9 0 号公報の段落 [0 0 4 0] 記載のアミラーゼ活性測定方法より決定される単位（I U）に基づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 5 0 ～ 5 0 0 0 0 0 I U が好ましい。

【 0 0 4 2 】

さらにリパーゼを併用する場合は、特表平 8 - 5 0 0 0 1 3 号公報の実施例 1 記載のリパーゼ活性測定方法より決定される単位（L U）づき、洗浄剤組成物 1 k g 当たり 1 0 0 0 0 ～ 1 0 0 0 0 0 0 L U が好ましい。

【 0 0 4 3 】

本発明の洗浄剤組成物には公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、例えば次のものが挙げられる。

【 0 0 4 4 】

（1）界面活性剤

界面活性剤は洗浄剤組成物中 0. 5 ～ 6 0 質量% 配合され、特に粉末状洗浄剤組成物については 1 0 ～ 4 5 質量%、液体洗浄剤組成物については 2 0 ～ 5 0 質量% 配合することが好ましい。また本発明洗浄剤組成物が漂白剤、または自動食器洗浄機用洗剤である場合、界面活性剤は一般に 1 ～ 1 0 質量%、好ましくは 1 ～ 5 質量% 配合される。

【0045】

本発明洗浄剤組成物に用いられる界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤の1種または組み合わせを挙げることが出来るが、好ましくは陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤である。

【0046】

陰イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールの硫酸エステル塩、炭素数8～20のアルコールのアルコキシル化物の硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩、 α -スルホ脂肪酸アルキルエステル塩又は脂肪酸塩が好ましい。本発明では特に、アルキル鎖の炭素数が10～14の、より好ましくは12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩が好ましく、対イオンとしては、アルカリ金属塩やアミン類が好ましく、特にナトリウム及び／又はカリウム、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンが好ましい。

【0047】

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）エーテル、アルキルポリグリコシド、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）フェニルエーテル、ポリオキシアルキレンソルビタン脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシアルキレングリコール脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマーが好ましい。特に、非イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールにエチレンオキシドやプロピレンオキシド等のアルキレンオキシドを4～20モル付加した〔HLB値（グリフィン法で算出）が10.5～15.0、好ましくは11.0～14.5であるような〕ポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。

【0048】

(2) 二価金属イオン捕捉剤

二価金属イオン捕捉剤は0.01～50質量%、好ましくは5～40質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる二価金属イオン捕捉剤としては、ト

リポリリン酸塩、ピロリン酸塩、オルソリン酸塩などの縮合リン酸塩、ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、合成層状結晶性ケイ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、ポリアセタールカルボン酸塩などが挙げられる。このうち結晶性アルミノケイ酸塩（合成ゼオライト）が特に好ましく、A型、X型、P型ゼオライトのうち、A型が特に好ましい。合成ゼオライトは、平均一次粒径 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ 、特に $0.1 \sim 5 \mu\text{m}$ のものが好適に使用される。

【0049】

（3）アルカリ剤

アルカリ剤は $0.01 \sim 80$ 質量%、好ましくは $1 \sim 40$ 質量%配合される。粉末洗剤の場合、デンス灰や軽灰と総称される炭酸ナトリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、並びにJIS1号、2号、3号などの非晶質のアルカリ金属珪酸塩が挙げられる。これら無機性のアルカリ剤は洗剤乾燥時に、粒子の骨格形成において効果的であり、比較的硬く、流動性に優れた洗剤を得ることができる。これら以外のアルカリとしてはセスキ炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどが挙げられ、またトリポリリン酸塩などのリン酸塩もアルカリ剤としての作用を有する。また、液体洗剤に使用されるアルカリ剤としては、上記アルカリ剤の他に水酸化ナトリウム、並びにモノ、ジ又はトリエタノールアミンを使用することができ、活性剤の対イオンとしても使用できる

【0050】

（4）再汚染防止剤

再汚染防止剤は $0.001 \sim 10$ 質量%、好ましくは $1 \sim 5$ 質量%配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる再汚染防止剤としてはポリエチレングリコール、カルボン酸系ポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。このうちカルボン酸系ポリマーは再汚染防止能の他、金属イオンを捕捉する機能、固体粒子汚れを衣料から洗濯浴中へ分散させる作用がある。カルボン酸系ポリマーはアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸などのホモポリマーないしコポリマーであり、コポリマーとしては上記モノマーとマレイン酸の共重合したものが好適であり、分子量が数千 ~ 10 万のものが好ましい。上記カル

ボン酸系ポリマー以外に、ポリグリシジル酸塩などのポリマー、カルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、並びにポリアスパラギン酸などのアミノカルボン酸系のポリマーも金属イオン捕捉剤、分散剤及び再汚染防止能を有するので好ましい。

【0051】

(5) 漂白剤

例えば過酸化水素、過炭酸塩などの漂白剤は1～10質量%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するときは、テトラアセチルエチレンジアミン (TAED) や特開平6-316700号公報記載などの漂白活性化剤 (アクチベーター) を0.01～10質量%配合することができる。

【0052】

(6) 蛍光剤

本発明洗浄剤組成物に用いられる蛍光剤としてはビフェニル型蛍光剤 (例えばチノパールCBS-Xなど) やスチルベン型蛍光剤 (例えばDM型蛍光染料など) が挙げられる。蛍光剤は0.001～2質量%配合するのが好ましい。

【0053】

(7) その他の成分

本発明品洗浄剤組成物には、衣料用洗剤の分野で公知のビルダー、柔軟化剤、還元剤 (亜硫酸塩など)、抑泡剤 (シリコーンなど)、香料、その他の添加剤を含有させることができる。

【0054】

本発明の洗浄剤組成物は、上記方法で得られた本発明品プロテアーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせることで常法に従って製造することができる。洗剤の形態は用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉体、顆粒、ペースト、固形などに行うことができる。

【0055】

斯くして得られる本洗浄剤組成物は、衣料洗浄剤、漂白剤、硬質表面洗浄用洗浄剤、排水管洗浄剤、義歯洗浄剤、医療器具用の殺菌洗浄剤などとして使用することができる。

【0056】

【実施例】

実施例 1

バチルス エスピー K S M - K P 4 3 株由来のアルカリプロテアーゼ構造遺伝子の終止コドンまでを含む約 2.0 kb の範囲に対し、エラー修復能の無い T a k a r a T a q (タカラ) 及び適当量の硫酸マンガン及びジメチルスルフォキシドを用い、エラープローン P C R を行うことにより、ランダム変異を与えた。上記約 2.0 kb の D N A を増幅出来るプライマー 1 (配列番号 3) 及びプライマー 2 (配列番号 4) を用い P C R を行った。プライマー 1 はセンス鎖の 5' 末端側に BamHI リンカーを、プライマー 2 はアンチセンス鎖の 5' 末端側に XbaI リンカーを付与した。P C R の条件は、94℃で 2 分間鋳型 D N A を変性させた後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、72℃で 2 分間を 1 サイクルとし 30 サイクル反応させた。増幅した D N A 断片を P C R P r o d u c t P u r i f i c a t i o n k i t (ロッシュ) にて精製し、末端制限酵素リンカーを、BamHI、XbaI により切断した。増幅 D N A を BamHI、XbaI 処理したプラスミド p H A 6 4 (特願平 8-323050: プロモーター 64 の下流に BamHI、XbaI 切断部位を有する) と混合した後、L i g a t i o n H i g h (東洋紡) により、リガーゼ反応を行った。エタノール沈殿により、リガーゼ反応液から回収したプラスミドを用い宿主菌であるバチルス エスピー K S M 9 8 6 5 株 (FERM P-18566) を形質転換した。

【0057】

9865 株の形質転換体をスキムミルク含有アルカリ寒天培地 [スキムミルク (デیفコ) 1% (w/v)、バクトトリプトン (デیفコ) 1%、酵母エキス (デیفコ) 0.5%、塩化ナトリウム 1%、寒天 1.5%、炭酸ナトリウム 0.05%、テトラサイクリン 15 ppm] に生育させ、ハローの形成状況により、変異プロテアーゼ遺伝子導入の有無を判定した。形質転換体は、5 mL の種母培地 [6.0% (w/v) ポリペプトン S、0.05% 酵母エキス、1.0% マルトース、0.02% 硫酸マグネシウム 7 水和物、0.1% リン酸 2 水素カリウム、0.25% 炭酸ナトリウム、30 ppm テトラサイクリン] に植菌し、30℃

で16時間振盪培養を行った。次いで30mLの主培地[8%ポリペプトンS、0.3%酵母エキス、10%マルトース、0.04%硫酸マグネシウム7水和物、0.2%リン酸2水素カリウム、1.5%無水炭酸ナトリウム、30ppmテトラサイクリン]に種母培養液を1% (v/v) 植菌し、30℃で3日間振盪培養を行った。

【0058】

得られた培養液を遠心分離し、培養上清中のプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性はカゼインを基質とした活性測定法により、タンパク質量はプロテインアッセイキット (和光純薬) を用いて測定した。野生型酵素遺伝子を有する形質転換体を同条件で培養した場合の培養上清の値と比較することにより、プロテアーゼ活性の向上が認められた変異プロテアーゼ遺伝子を選抜した。

【0059】

選抜された形質転換体からHigh Pure Plasmid Isolation kit (ロッシュ) を用いプラスミドを回収し、塩基配列を決定した。プラスミドDNA300ngを鋳型として、プライマーとBig Dye DNA Sequencing kit (アプライドバイオシステム) を用いて20μLの反応系でPCR反応を行い、DNA Sequencer 377型 (アプライドバイオシステムズ) を用いた解析に供した。その結果、プロテアーゼの生産性が向上した変異体は15位のセリンがヒスチジンに置換された酵素、16位のセリンがスレオニンに置換された酵素、15位のセリン及び16位のセリンがそれぞれヒスチジン、グルタミンに置換された二重変異、166位のアスパラギンがグリシンに置換された酵素、167位のグリシンがバリンに置換された酵素、166位のアスパラギン及び167位のグリシンがそれぞれグリシン、バリンに置換された二重変異、187位のアスパラギンがセリンに置換された酵素、346位のリジンがアルギニンに置換された酵素、405位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換された酵素、346位のリジン及び405位のアスパラギンがそれぞれアルギニン、アスパラギン酸に置換された二重変異であった。上記において特に生産性の向上が顕著であった変異体は、15位のセリン及び16位のセリンがそれぞれヒスチジン、グルタミンに置換された二重変異体、166位

のアスパラギン及び167位のグリシンがそれぞれグリシン、バリンに置換された二重変異体、346位のリジン及び405位のアスパラギンがそれぞれアルギニン、アスパラギン酸に置換された二重変異体及び187位のアスパラギンがセリンに置換された変異体であった。

【0060】

培養液の一部を希釈し、2 mM塩化カルシウムを含む10 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）で平衡化したDEAE-トヨパール（東ソー）カラムにかけ、非吸着画分を回収することにより、ほぼ均一なプロテアーゼを得た。各精製酵素のタンパク質量、カゼイン分解活性を測定した結果から、生産性向上の要因は、野生型酵素の分泌量あるいは比活性を100%とした場合、上記変異の導入によりタンパク質分泌量の向上（102-108%）あるいは比活性の向上（104-121%）であった（表2）。

【0061】

次にそれぞれの変異点を組合せる目的でプライマー1～8（配列番号3～10）及びPyrobest（タカラ）を用いてリコンビナントPCR法により多重変異体を作製した。すなわち、アルカリプロテアーゼ構造遺伝子の翻訳開始点から15位及び16位を含んだDNA断片約700 bpをプライマー1（配列番号3）とプライマー3（配列番号5）により、166位及び167位を含んだDNA断片約500 bpをプライマー4（配列番号6）とプライマー5（配列番号7）により、187位を含んだDNA断片400 bpをプライマー6（配列番号8）とプライマー7（配列番号9）により、346位と405位を含み、アルカリプロテアーゼ構造遺伝子の終止コドンまでを含むDNA断片約500 bpをプライマー2（配列番号4）とプライマー8（配列番号10）により、野生型遺伝子と変異遺伝子を鋳型にそれぞれ増幅し、それぞれを組合せ、各変異体を作製した。各変異体を培養しプロテアーゼの生産性を評価した結果、S15H/S16Q/K346R/N405D、S15H/S16Q/N187S/K346R/N405D及びS15H/S16Q/N166G/G167V/N187S/K346R/N405Dにおいて生産性の向上が認められた。その要因は、野生型酵素のタンパク質分泌量あるいは比活性を100%とした場合、各多重変異体におけるタンパク質分泌量の向上（107-112%）あるいは比活性の向上（103-115%）で

あった(表2)。

【0062】

【表2】

	相対タンパク質 分泌量 (%)	相対比活性 (%)
野生型	100	100
S15H+S16T	102	101
S15H+S16Q	108	104
N166G+G167V	100	121
N187S	101	108
K346R+N405D	102	107
S15H+S16Q+K346R+N405D	112	103
S15H+S16Q+N187S+K346R+N405D	107	113
S15H+S16Q+N166G+G167V+N187S+K346R+N405D	111	115

【0063】

上記の本発明アルカリプロテアーゼ変異体はカゼインに対するタンパク質分泌量を向上させる、又は比活性を向上させる、或いはタンパク質分泌量を向上させ、かつプロテアーゼ比活性を向上させる以外は親アルカリプロテアーゼの特性、すなわち、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEにより認められる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ性域で活性を有する性質を保持していることを確認した。

【0064】

参考例

〔プロテアーゼ活性測定法(カゼイン法)〕

カゼイン(ハンマーステイン氏法:メルク)1%(w/v)を含む50mMホウ酸緩衝液(pH10.5)1mLを30℃、5分間恒温した後、0.1mLの酵素液を添加し反応を開始した。15分間反応させた後、2mLの反応停止液(0.11Mトリクロロ酢酸/0.22M酢酸ナトリウム/0.33M酢酸)を加えた。室温で30分間放置し、沈殿物をワットマンNo1濾紙を用いて濾過した。分解産物はLowryらの方法により定量した。即ち、0.5mLの濾液に2.5mLのアルカリ性銅溶液(1%ロッシェル塩:1%硫酸銅・5水和物:2%炭酸ナトリウム/0.1N水酸化ナトリウム溶液=1:1:100)を加え、3

0℃で10分間恒温した後、0.25 mLのフェノール試薬〔市販のフェノール試薬（関東化学）を脱イオン水にて2倍に希釈した溶液〕を添加、よく攪拌し、30℃で30分間放置した。その後、660 nmにおける吸光度を測定した。プロテアーゼ1単位（1PU）は、上記反応条件下において1分間に1 mmolのチロシンに相当する酸可溶性タンパク質を生成するのに必要な酵素量とした。

【0065】

実施例2

（1）洗剤の調製

攪拌翼を有した1 m³の混合槽に水465 kgを加え、水温が55℃に達した後に40%（w/v）ポリアクリル酸ナトリウム水溶液135 kgを添加した。15分間攪拌した後に、炭酸ナトリウム120 kg、硫酸ナトリウム60 kg、亜硫酸ナトリウム9 kg、蛍光染料3 kgを添加した。更に15分間攪拌した後に、ゼオライト300 kgを添加し、30分間攪拌して均質なスラリーを得た（スラリー中の水分は50質量%）。このスラリーを噴霧乾燥塔の塔頂付近に設置した圧力噴霧ノズルから噴霧することでベース顆粒を得た（噴霧乾燥塔に供給する高温ガスは塔下部より温度が225℃で供給し、塔頂より105℃で排出）。

【0066】

次にレディゲミキサー（松阪技研(株)製、容量20 L、ジャケット付）に上記ベース顆粒100質量部を投入し、主軸（150 rpm）の攪拌下、非イオン性界面活性剤20質量部、直鎖アルキル（炭素数10～13）ベンゼンスルホン酸ナトリウム22質量部、脂肪酸（炭素数14～18）ナトリウム4質量部、ポリエチレングリコール2質量部、水4質量部の混合液を3分間で投入し、その後5分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム20質量部とゼオライト10質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

【0067】

洗剤ベース99質量%に本発明品プロテアーゼ粒子0.5質量%、及び香料0.5質量%を混合して最終粒状洗剤Aを得た。

【0068】

（2）使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が 8.5 のエマルゲン 108 KM (花王(株)製)

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量 10000 (特公平 2-24283 号公報の実施例に記載の方法に従って製造した)

炭酸ナトリウム：デンス灰 (セントラル硝子(株)製)

ゼオライト：平均粒径が 3.5 μ m のゼオライト 4A 型 (東ソー(株)製)

ポリエチレングリコール：K-PEG 6000 (平均分子量 8500, 花王(株)製)

結晶性ケイ酸ナトリウム：粉末 SKS-6 (ヘキストトクヤマ(株)製)

本発明品プロテアーゼ粒子：表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

蛍光染料：チノパール CBS-X (チバガイギー社製)

【0069】

実施例 3

(1) 洗剤の調製

まず固形分 50 質量%のスラリーを熱風温度 250℃で噴霧乾燥し、ポリアクリル酸ナトリウム (質量平均分子量 10000) 7 質量%、炭酸ナトリウム 26 質量%、硫酸ナトリウム 20 質量%、塩化ナトリウム 6 質量%、蛍光染料 0.5 質量%、ゼオライト 40 質量%、水 0.5 質量%のベース顆粒を得た。

【0070】

次にレディゲミキサー (松阪技研(株)製、容量 20L、ジャケット付) に上記ベース顆粒 100 質量部を投入し、主軸 (150 rpm) の攪拌下、非イオン性界面活性剤 20 質量部、直鎖アルキル (炭素数 10~13) ベンゼンスルホン酸ナトリウム 22 質量部、脂肪酸 (炭素数 14~18) ナトリウム 4 質量部、ポリエチレングリコール 2 質量部、水 4 質量部の混合液を 3 分間で投入し、その後 5 分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム 20 質量部とゼオライト 10 質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

【0071】

洗剤ベース 95 質量% に漂白剤粒子 2.8 質量%、漂白活性剤粒子 1.2 質量%、本発明品プロテアーゼ粒子 0.5 質量%、及び香料 0.5 質量% を混合して最終粒状洗剤 B を得た。

【0072】

(2) 使用した原料

【0073】

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が 8.5 のエマルゲン 108 KM (花王(株)製)

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量 10000 (特公平 2-24283 号公報の実施例に記載の方法に従って製造した)

炭酸ナトリウム：デンス灰 (セントラル硝子(株)製)

ゼオライト：平均粒径が 3.5 μ m のゼオライト 4A 型 (東ソー(株)製)

ポリエチレングリコール：K-PEG 6000 (平均分子量 8500, 花王(株)製)

結晶性ケイ酸ナトリウム：SKS-6 (ヘキストトクヤマ(株)製)

本発明品プロテアーゼ粒子：表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 PU/g)

蛍光染料：チノパール CBS-X (チバガイギー社製)

【0074】

実施例 4

表 3 に示す液体洗浄剤組成物 (洗剤 C、及び洗剤 D) を調製した。

【0075】

【表 3】

成分	洗剤C (質量%)	洗剤D (質量%)
非イオン性界面活性剤 ¹⁾	25.0	-
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0	-
非イオン性界面活性剤 ³⁾	10.0	-
非イオン性界面活性剤 ⁴⁾	-	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁵⁾	-	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁶⁾	-	2.5
陰イオン界面活性剤 ⁷⁾	1.0	-
シリコーン ⁸⁾	-	0.8
カルボン酸系ポリマー ⁹⁾	2.0	-
ポリマー ¹⁰⁾	-	0.8
クエン酸	0.2	-
塩化カルシウム	0.05	-
モノエタノールアミン	4.0	-
トリエチレングリコールフェニルエーテル	3.0	-
プロピレングリコール	3.0	-
エタノール	2.0	2.0
亜硫酸ナトリウム	0.2	-
本発明品プロテアーゼ ¹¹⁾	0.5	1.0
香料	0.5	0.5
水	残部	残部
合計	100	100
使用濃度	20g/30L	40g/30L
洗浄液の pH	10.5	7.3

【0076】

1) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均7モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール70、日本触媒化学工業製）

2) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均12モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール120、日本触媒化学工業製）

3) 炭素数10～14の直鎖第1級アルコールにEOを平均5モル、POを平均2モル、EOを平均3モルの順にブロック付加させたもの

4) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均8モル付加させたもの

5) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均 11.5 モル付加させたもの

6) ナローレンジポリオキシエチレンアルキル (sec-C₁₂/C₁₃) エーテル

7) 炭素数 10~14 の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

【0077】

8) アミド/エーテル変性シリコーンポリマー (東レ・ダウコーニングシリコーン(株)製、BY16-906)

9) 特開平 10-60476 の 11 項 6 行~13 行記載の方法で合成したフェノキシポリエチレングリコール、アクリル酸、マレイン酸共重合体 (質量平均分子量 10000、固形分 51.2%)

10) ペンテン/マレイン酸 (50/50 モル比) コポリマーのナトリウム塩 (質量平均分子量 7000)

11) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品 (15PU/mL)

【0078】

実施例 5

下記の表 4 に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム (デンス灰) を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム 40% 水溶液、及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、又は非イオン性界面活性剤、又はラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した本発明のアルカリプロテアーゼ粒子を添加し、全体的に均一になる程度攪拌することにより、漂白剤を調製した。

【0079】

【表 4】

成分	漂白剤E (質量%)	漂白剤F (質量%)
過炭酸ナトリウム ¹⁾	72.0	72.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	20.0	20.0
陰イオン性界面活性剤 ²⁾	2.0	-
非イオン性界面活性剤 ³⁾	-	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム ⁴⁾	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム	4.0	4.0
本発明アルカリプロテアーゼ ⁵⁾	1.0	1.0

【0080】

- 1) 粒経 500～700 μm
- 2) 炭素数 12～14 の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
- 3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (アルキル基の炭素数 12～14、EO 平均付加モル数 12)
- 4) 平均分子量 8,000
- 5) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

【0081】

実施例 6

下記の表 5 に示す全自動食器洗浄機用洗浄剤組成物 (洗剤 G、及び H) を調製した。

【0082】

【表 5】

成分	洗剤G (質量%)	洗剤H (質量%)
プルロニック L-61 ¹⁾	-	4.0
ソフタノール EP-7085 ²⁾	4.0	-
クエン酸 3 ナトリウム	-	30.0
トリポリリン酸ナトリウム	30.0	-
過炭酸ナトリウム	20.0	20.0
炭酸ナトリウム	20.0	20.0
非晶質珪酸塩 ³⁾	10.0	10.0
AA-MA ⁴⁾	4.0	4.0
硫酸ナトリウム	10.0	10.0
α -アミラーゼ ⁵⁾	1.0	1.0
本発明アルカリプロテアーゼ ⁶⁾	1.0	1.0

【0083】

1) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体 (平均分子量 2,000)

2) 炭素数 12~14 の sec-アルコールのエチレンオキサイド 7 モル、及びプロピレンオキサイド 8.5 モル付加物

3) JIS 2 号珪酸ナトリウム

4) アクリル酸-マレイン酸共重合体

5) デュラミル 60T (登録商標; ノボザイムズ社)

6) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 PU/g)

【0084】

実施例 7

下記の表 6 に示す各成分を用い、硬質表面用洗浄剤組成物 (洗剤 J) を得た。

【0085】

【表 6】

成分	洗剤 J (質量%)
陰イオン界面活性剤 ¹⁾	15.0
非イオン界面活性剤 ²⁾	5.0
非イオン界面活性剤 ³⁾	5.0
両性界面活性剤 ⁴⁾	7.5
両性界面活性剤 ⁵⁾	4.0
クエン酸	1.0
ポリプロピレングリコール ⁶⁾	2.0
エタノール	5.0
本発明品プロテアーゼ ⁷⁾	1.0
香料、水、その他／pH調整剤	54.5
合計	100.0

【0086】

1) ポリオキシエチレン (EOP=4) アルキル (C12) エーテル硫酸エステルナトリウム

2) ポリオキシエチレン (EOP=8) アルキル (C12) エーテル

3) アルキル (C12) ポリグルコシド (縮合度 1.3)

4) モノ長鎖第3級アルキル (C12) ジメチルアミノキシド

5) アルキル (C12) ヒドロキシジメチルスルホベタイン

6) 分子量 10000

7) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品 (15PU/mL)

【0087】

実施例 8

前記洗剤 A (実施例 2 参照) を用いて下記表 7 記載の粒状洗剤を得た。

【0088】

【表 7】

成分 (質量%)	洗剤K	洗剤L	洗剤M	洗剤N
実施例 2 の洗剤ベース	98.4	98.3	98.5	97.2
香料	0.5	0.5	0.5	0.5
本発明品プロテアーゼ ¹⁾	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ ²⁾	0.6			0.6
セルラーゼ ³⁾		0.7		0.7
リパーゼ ⁴⁾			0.5	0.5

【0089】

1) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

2) 特開平 5-25492 号公報に記載のプロテアーゼ K-16 を特開昭 62-257990 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき、5PU/g としたもの

3) KAC-500 (登録商標; 花王)

4) リポラーゼ 100T (登録商標; ノボザイムズ社)

【0090】

【発明の効果】

本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、タンパク質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、培地中に効率よく分泌される、生産性が高いアルカリプロテアーゼを提供できる。

【0091】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Alkali protease

<130> P01501504

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<400> 1

Asn	Asp	Val	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Ala	Gln	Ser	Ser
1				5					10					15	
Tyr	Gly	Leu	Tyr	Gly	Gln	Gly	Gln	Ile	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Gly
				20				25						30	
Leu	Asp	Thr	Gly	Arg	Asn	Asp	Ser	Ser	Met	His	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly
				35				40						45	
Lys	Ile	Thr	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Arg	Thr	Asn	Asn	Ala	Asn	Asp
				50				55						60	
Thr	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Gly
				65				70						75	
Ser	Thr	Asn	Lys	Gly	Met	Ala	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Phe	Gln	Ser
				85				90						95	
Ile	Met	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Leu	Gln
				100				105						110	
Thr	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Tyr	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Ile	His	Thr	Asn
				115				120						125	
Ser	Trp	Gly	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Ala	Tyr	Thr	Thr	Asp	Ser	Arg	Asn
				130				135						140	
Val	Asp	Asp	Tyr	Val	Arg	Lys	Asn	Asp	Met	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Ala

145	150	155	160
Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala			
	165	170	175
Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe			
	180	185	190
Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg			
	195	200	205
Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly			
	210	215	220
Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe			
225	230	235	240
Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met			
	245	250	255
Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe			
	260	265	270
Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala			
	275	280	285
Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn			
	290	295	300
Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr			
305	310	315	320
Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser			
	325	330	335
Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser			
	340	345	350
Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu			
	355	360	365
Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp			
	370	375	380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu
385 390 395 400
Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val
 405 410 415
Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile
 420 425 430
Val Asn

<210> 2

<211> 1923

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1920)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(618)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (619)..()

<223>

<400> 2

atg aga aag aag aaa aag gtg ttt tta tct gtt tta tca gct gca 45

Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala

-205

-200

-195

gcg att ttg tcg act gtt gcg tta agt aat cca tct gca ggt ggt 90

Ala Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly

-190

-185

-180

gca agg aat ttt gat ctg gat ttc aaa gga att cag aca aca act 135

Ala Arg Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr

-175

-170

-165

gat gct aaa ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct 180

Asp Ala Lys Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala

-160

-155

-150

ttt ctg gtg gaa tct gaa aat gtg aaa ctc cca aaa ggt ttg cag 225

Phe Leu Val Glu Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln

-145

-140

-135

aag aag ctt gaa aca gtc ccg gca aat aat aaa ctc cat att atc 270

Lys Lys Leu Glu Thr Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile

-130

-125

-120

caa ttc aat gga cca att tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa 315

Gln Phe Asn Gly Pro Ile Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu

-115

-110

-105

aaa aca ggg gca aag att ctc gac tac ata cct gat tat gct tac att 363
 Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile
 -100 -95 -90

gtc gag tat gag ggc gat gtt aag tca gca aca agc acc att gag cac 411
 Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His
 -85 -80 -75 -70

gtg gaa tcc gtg gag cct tat ttg ccg ata tac aga ata gat ccc cag 459
 Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln
 -65 -60 -55

ctt ttc aca aaa ggg gca tca gag ctt gta aaa gca gtg gcg ctt gat 507
 Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp
 -50 -45 -40

aca aag cag aaa aat aaa gag gtg caa tta aga ggc atc gaa caa atc 555
 Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile
 -35 -30 -25

gca caa ttc gca ata agc aat gat gtg cta tat att acg gca aag cct 603
 Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro
 -20 -15 -10

gag tat aag gtg atg aat gat gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat 651
 Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp
 -5 -1 1 5 10

gtg gct cag agc agc tac ggg ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg 699

Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala

15

20

25

gtt gcc gat aca ggg ctt gat aca ggt cgc aat gac agt tcg atg cat 747

Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His

30

35

40

gaa gcc ttc cgc ggg aaa att act gca tta tat gca ttg gga cgg acg 795

Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr

45

50

55

aat aat gcc aat gat acg aat ggt cat ggt acg cat gtg gct ggc tcc 843

Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser

60

65

70

75

gta tta gga aac ggc tcc act aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat 891

Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn

80

85

90

cta gtc ttc caa tct atc atg gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta 939

Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu

95

100

105

cct tcg aat ctg caa acc tta ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc 987

Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala

110

115

120

aga att cat aca aac tcc tgg gga gca gca gtg aat ggg gct tac aca 1035

Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr

125	130	135	
aca gat tcc aga aat gtg gat gac tat gtg cgc aaa aat gat atg acg			1083
Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr			
140	145	150	155
atc ctt ttc gct gcc ggg aat gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt			1131
Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser			
160	165	170	
gca cca ggc aca gct aaa aat gca ata aca gtc gga gct acg gaa aac			1179
Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn			
175	180	185	
ctc cgc cca agc ttt ggg tct tat gcg gac aat atc aac cat gtg gca			1227
Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala			
190	195	200	
cag ttc tct tca cgt gga ccg aca aag gat gga cgg atc aaa ccg gat			1275
Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp			
205	210	215	
gtc atg gca ccg gga acg ttc ata cta tca gca aga tct tct ctt gca			1323
Val Met Ala Pro Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala			
220	225	230	235
ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg aac cat gac agt aaa tat gca tac atg			1371
Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met			
240	245	250	

ggt gga acg tcc atg gct aca ccg atc gtt gct gga aac gtg gca cag 1419
Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln

255

260

265

ctt cgt gag cat ttt gtg aaa aac aga ggc atc aca cca aag cct tct 1467
Leu Arg Glu His Phe Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser

270

275

280

cta tta aaa gcg gca ctg att gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc 1515
Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly

285

290

295

tac ccg aac ggt aac caa gga tgg gga cga gtg aca ttg gat aaa tcc 1563
Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser
300 305 310 315

ctg aac gtt gcc tat gtg aac gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa 1611
Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln

320

325

330

aaa gcg acg tac tcg ttt act gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc 1659
Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile

335

340

345

tcc ctg gta tgg tct gat gcc cct gcg agc aca act gct tcc gta acg 1707
Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr

350

355

360

ctt gtc aat gat ctg gac ctt gtc att acc gct cca aat ggc aca cag 1755

Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln

365

370

375

tat gta gga aat gac ttt act tcg cca tac aat gat aac tgg gat ggc 1803

Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly

380

385

390

395

cgc aat aac gta gaa aat gta ttt att aat gca cca caa agc ggg acg 1851

Arg Asn Asn Val Glu Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr

400

405

410

tat aca att gag gta cag gct tat aac gta ccg gtt gga cca cag acc 1899

Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr

415

420

425

ttc tcg ttg gca att gtg aat taa 1923

Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn

430

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

aaatggatcc gtgaggaggg aaccgaatga gaaagaagaa aaaggtg 47

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

atattctaga cgattacat attaatcct ctaccc 36

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gcaaccgcta cgatctgtcc 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cagatcgtag cggttgccg 19

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ttccgtagct ccgactgtta ttgc 24

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gcaataacag tcggagctac g 21

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

aatgtcactc gtcccatcc ttgg 24

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ggatggggac gagtgacatt gg 22

【図面の簡単な説明】

【図 1】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上の相同性を有するプロテアーゼのアミノ酸配列を整列させた図である。

【書類名】 図面

【図 1】

KP43 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDTNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
KP9860 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDTNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
KP9865 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDTNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
E-1 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDPNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 89
Ya 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDPNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 89
SD-521 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDPNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 89
A-1 1:NDVARGIVKADVAQSSYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDPNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 90
A-2 1:NDVARGIVKADVAQNNYGLYQGGQIVAVADTGLDTRNDSSMHEAFRGKITALLYALGRTNNANDPNGHGTHVAGSVLNGSTNKGMAPQA 89

KP43 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAY SAGARIHTNSWCAAVNGAYTTDSRVDDYVRKNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 180
KP9860 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAY SAGARIHTNSWCAAVNGAYTTDSRVDDYVRKNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 180
KP9865 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAY SAGARIHTNSWCAAVNGAYTTDSRVDDYVRKNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 180
E-1 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAWNAGARIHTNSWCAAVNGAYTANSRQVDEYVRNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 179
Ya 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAWNAGARIHTNSWCAAVNGAYTANSRQVDEYVRNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 179
SD-521 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAWNAGARIHTNSWCAAVNGAYTANSRQVDEYVRNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 179
A-1 91:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAY SAGARIHTNSWCAAVNGAYTTDSRVDDYVRKNDMAVLFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 180
A-2 90:NLVFQSIMDSSGGLGGLPSNLQTLFSQAY SAGARIHTNSWCAAVNGAYTTDSRVDDYVRKNDMTILFAAGNEGPNNGGTISAPGTAKNAI 179

KP43 181:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
KP9860 181:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
KP9865 181:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
E-1 180:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
Ya 180:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
SD-521 180:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269
A-1 181:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 270
A-2 180:TVGATENLRPSFGSIADNINHVAQFSSRGPTDGRIPKDVMAPGTIFLSARSSLAPDSSFWANHDSKYAYMGGTSMATPIVAGNVAQLRE 269

KP43 271:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGAADIGLGYPNGNQGWGRVTLDKSLNVAIVNESSSLSTSQKATYSFTATAGKPLKISLVWSDAPASTTA 360
KP9860 271:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGAADIGLGYPNGNQGWGRVTLDKSLNVAIVNESSSLSTSQKATYSFTATAGKPLKISLVWSDAPASTTA 360
KP9865 271:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGAADIGLGYPNGNQGWGRVTLDKSLNVAIVNESSSLSTSQKATYSFTATAGKPLKISLVWSDAPASTTA 360
E-1 270:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGATDVGLGYPSGDQGWGRVTLDKSLNVAIVNEATALTGQKATYSFQAGKPLKISLVWSDAPASTTA 359
Ya 270:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGATDVGLGYPSGDQGWGRVTLDKSLNVAIVNEATALTGQKATYSFQAGKPLKISLVWSDAPASTTA 359
SD-521 270:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGATDVGLGYPSGDQGWGRVTLDKSLNVAIVNEATALTGQKATYSFQAGKPLKISLVWSDAPASTTA 359
A-1 271:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGATDVGLGYPSGDQGWGRVTLDKSLNVAIVNEATALTGQKATYSFQAGKPLKISLVWSDAPASTTA 360
A-2 270:HFVKNRGITPKPSLLKAAL IAGAADIGLGYPNGNQGWGRVTLDKSLNVAIVNESSSLSTSQKATYSFTATAGKPLKISLVWSDAPASTTA 359

KP43 361:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
KP9860 361:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
KP9865 361:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
E-1 360:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
Ya 360:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
SD-521 360:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433
A-1 361:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 434
A-2 360:SVTLVNDLDL VITAPNGTQYVGNDFTSYDNNWDGRNNVENVF INAPQSGTYYIEVQAYNVVPGPQTFSLAIVN 433

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複合汚れに対しても優れた洗浄性を有するアルカリプロテアーゼのタンパク質分泌量、比活性を向上させ、高い生産性を達成する。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の(a)15位、(b)16位、(c)166位、(d)167位、(e)187位、(f)346位、(g)405位、又はこれに相当する位置から選ばれる位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；(a)位置；ヒスチジン、(b)位置；スレオニンまたはグルタミン、(c)位置；グリシン、(d)位置；バリン、(e)位置；セリン、(f)位置；アルギニン、(g)位置；アスパラギン酸、であるアルカリプロテアーゼ；これをコードする遺伝子。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 9
受付番号	5 0 3 0 0 5 9 6 7 3 0
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 4月10日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 0 6 7 0 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名 花王株式会社